

University of Groningen

Cellular stress response during hepatitis C virus infection

Rios Ocampo, Wilson

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2018

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Rios Ocampo, W. (2018). *Cellular stress response during hepatitis C virus infection: a balancing act between viral persistence and host cell survival*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



Appendices

Nederlandse samenvatting
Acknowledgements
Curriculum vitae
List of publications

Nederlandse Samenvatting

Het hepatitis C virus (HCV) is een virus dat hepatocyten, de parenchymale levercellen, infecteert. Deze infectie veroorzaakt een acute en/of chronische leverontsteking (hepatitis) en kan uiteindelijk leiden tot leverfibrose en leverkanker. Volgens gegevens van de WHO zijn wereldwijd ongeveer 80 miljoen mensen geïnfecteerd met het virus en overlijden jaarlijks 400.000 patiënten aan een HCV-gerelateerde ziekte.

Onze kennis over het virus is in de laatste decennia belangrijk toegenomen en ook zijn goede antivirale middelen ontwikkeld. Deze zijn echter wereldwijd niet overal beschikbaar. Ondanks deze vooruitgang blijven er nog belangrijke vragen onbeantwoord, met name wat betreft de interactie tussen virus en gastheercel (de hepatocyt).

HCV behoort tot de familie van *Flaviviridae*, genus Hepacivirus. Het HCV genoom is een positief, enkelstrengs RNA molecuul dat een polyproteïne codeert welke uiteindelijk in 10 verschillende functionele eiwitten wordt gesplitst.

Het HCV infecteert voornamelijk de parenchymale levercel of hepatocyt, hoewel extrahepatische replicatie van het virus ook is aangetoond. Na infectie met het virus vindt replicatie en synthese van virale eiwitten in de hepatocyt plaats. Tegelijkertijd leidt de infectie tot een antivirale immuun- en ontstekingsreactie in de gastheer. Beide processen veroorzaken stress in de hepatocyt, met name oxidatieve stress en stress in het endoplasmatisch reticulum (ER) waar de virale eiwitsynthese plaatsvindt. Een aantal virale eiwitten, met name Core, NS3/4A en NS5A veroorzaken oxidatieve stress. Geïnfecteerde hepatocyten worden dus tegelijkertijd blootgesteld aan meerdere stressoren en dit kan celdood veroorzaken. Om celdood te voorkomen hebben hepatocyten adaptieve mechanismen ontwikkeld waardoor zij beter bestand zijn tegen deze stressoren.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richt zich op deze adaptieve mechanismen en de consequenties van het activeren van deze mechanismen

voor persistentie van het virus en bescherming tegen celdood. Wij hebben ons in dit onderzoek vooral gericht op i) ER stress, het gevolg van de synthese van virale eiwitten en ii) oxidatieve stress, het gevolg van de immuun/ontstekingsreactie tegen geïnfecteerde cellen. Wij hebben hierbij vooral aandacht geschonken aan de virale eiwitten Core, NS3/4A en NS5A omdat van deze eiwitten bekend is dat ze oxidatieve stress veroorzaken.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de epidemiologie, klinisch beloop en behandeling van HCV infecties, alsmede de structuur en replicatiecyclus van het virus.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de huidige kennis over de interactie tussen de gastheercel en het virus. Hierbij wordt vooral ingegaan op de adaptieve response na blootstelling aan oxidatieve stress en ER stress. Gastheercellen beschikken over verschillende adaptieve mechanismen om zich tegen deze stressoren te beschermen, b.v. verminderde virale eiwitsynthese, verhoging van de eiwitvouwingscapaciteit en inductie van anti-oxidatieve mechanismen, zoals ROS-detoxificerende enzymen (ROS: reactive oxygen species: reactieve zuurstofverbindingen), verhoogde glutathion synthese etc. In het vervolg van dit hoofdstuk worden de consequenties van de activatie van adaptieve mechanismen voor viruspersistentie en -infectie besproken en het 'gastheerdilemma'. Het gastheerdilemma behelst het feit/de theorie (?) dat bescherming van de gastheer(cel) tegen oxidatieve stress en ER stress, kan leiden tot instandhouding van de virusinfectie en dat activatie van adaptieve mechanismen daarmee ook onbedoelde neveneffecten heeft.

In **Hoofdstuk 3** beschrijven wij ons eerste modelsysteem om het effect van virale eiwitsynthese op de stress respons van hepatocyten te bestuderen. Huh7 humane hepatoma cellen werden getransfecteerd met constructen die de HCV eiwitten, Core en NS3/4A kortstondig tot expressie brengen. Vervolgens werden deze cellijnen blootgesteld aan externe oxidatieve stress, opgewekt door middel van menadione, een superoxide anion donor. Parameters die werden gemeten waren o.a. productie van ROS, apoptose (caspase-3 activiteit), expressie van anti-oxidant genen en merkers van ER stress en autofagie (LC3 en p62). Hepatoma cellen die Core en NS3/4A tot expressie brengen bleken

minder gevoelig voor externe oxidatieve stress opgewekt door menadione. Dit bleek o.a. uit verminderde (mitochondriële) ROS productie en ROS-geïnduceerde apoptose. In Huh7 cellen getransfecteerd met NS3/4A trad ook minder ER stress op. Een interessante waarneming was de toegenomen afbraak van het Core eiwit en het autofagie-gerelateerde eiwit p62 na blootstelling aan externe oxidatieve stress. Dit geeft aan dat de combinatie van stressoren niet leidt tot een synergistisch schadelijk effect, maar juist tot een vermindering van oxidatieve stress door toegenomen afbraak van één van de stressoren (Core). Dit adaptieve mechanisme kan bijdragen tot de overleving van de (geïnfecteerde) gastheercel (hepatocyt).

In **Hoofdstuk 4** hebben wij Huh7 cellen gebruikt die stabiel getransfecteerd zijn met verschillende virale eiwitten als model voor chronische HCV infectie. In dit hoofdstuk hebben wij ook in meer detail de betrokkenheid van stress-gerelateerde signaaltransductie routes onderzocht en de rol van autofagie als 'anti-stress' mechanisme. Autofagie treedt op bij HCV infectie en het proces van autofagie kan op verschillende niveaus gemoduleerd worden: inductie, flux en lysis/degradatie van autofagiesubstraten. Huh7 cellen, die Core, NS3/4A of NS5A stabiel tot expressie brachten werden blootgesteld aan externe oxidatieve stress door menadione. Onder deze omstandigheden trad specifieke afbraak van Core en NS5A op. Deze afbraak werd voorkomen door anti-oxidanten (N-acetylcysteïne). Afbraak van de HCV eiwitten correleerde met sterk verminderde ROS productie en oxidatieve stress-geïnduceerde apoptose. Fosforylering van het stress-gerelateerde signaaltransductie eiwit eIF2a en de toegenomen expressie van ATF4 en CHOP suggereren de betrokkenheid van de eIF2a/ATF4 signaaltransductie route. HCV Core en NS5A degradatie correleerde tevens met een afname van de autofagie-gerelateerde eiwitten p62/SQSTM1. Daarnaast bleek knockdown van p62/SQSTM1 door middel van siRNA techniek de afbraak van de HCV eiwitten, Core en NS5A, deels te voorkomen, hetgeen suggereert dat p62/SQSTM1 een belangrijke rol speelt als receptoreiwit voor de eliminatie van schadelijke eiwitten zoals HCV Core en NS5A.

In **Hoofdstuk 5** hebben wij de interactie bestudeerd tussen hepatocyten die HCV eiwitten tot expressie brengen en lever stercellen. Stercellen

zijn fibroblast-achtige cellen in de lever die verantwoordelijk zijn voor de overmatige productie van extracellulaire matrix tijdens leverfibrogenese. Het doel van dit pilot-onderzoek was om te bepalen of virus-geïnfekteerde hepatocyten signalen afscheiden die stellaatcellen kunnen activeren en aanzetten tot verhoogde extracellulaire matrix productie, zoals gebeurt tijdens HCV-gerelateerde leverfibrose. Wij presenteren in dit hoofdstuk een *in vitro* model voor hepatocyt-stellaatcel interactie met gebruikmaking van een trans-well co-culture systeem. Een pro-fibrogeen effect van Huh7 cellen die HCV Core en NS3/4A tot expressie brengen op stellaatcellen kon worden aangetoond.

Hoofdstuk 6 is een samenvatting en discussie van onze belangrijkste bevindingen. Wij speculeren in dit hoofdstuk ook over de consequenties van ons onderzoek voor eventuele nieuwe aangrijpingspunten voor therapie. Onze studies dragen bij aan het begrip van virus-gastheer interacties en kunnen op termijn leiden tot nieuwe, therapeutische interventies.

Acknowledgements

After so many years it has come the day to write down this final note of thanks. It is the finishing touch of an intense process of learning, not only in the scientific arena, but also on a personal level. Thinking of all the people that has been part of this journey has a great impact on me and I want to reflect on these pages all the people that have supported and helped me...

First at all, I thank my family for their support and unconditional love. I am more than grateful for your patience during all those years of absence.

-Gracias Familia, Armando (papá), Martha (mamá), Camilo, Astrid, Ana (hermanos) y Matias (sobrino) ustedes son una parte esencial de mi vida. Su apoyo incondicional me llenó de fuerzas para no desfallecer en los momentos críticos durante mi formación. Gracias por los momentos de espera, por no criticar mi ausencia y valorar mis deseos de superación. A Matias muy especialmente agradezco el tiempo, paciencia y comprensión en los momentos que no pudimos jugar. A mis tías Victoria, Edelmira y Margarita, a mis primas Sandra y Diana y mi hermosa Ariadna, gracias por cada llamada durante mi estadía en Groningen-.

I would like to express my deep gratitude to professor Maria Cristina Navas for the trust she placed on me since I decided to start my research career. Thanks Macris for giving me the opportunity to join the Gastrohepatology group and for allowing me to grow as a young scientist next to you. I also want to thank you for enabling so many research projects and conferences and more specially for making possible the culmination of my PhD. Likewise, I am deeply grateful to my supervisor professor Han Moshage for the opportunity to join MDL group to continue my PhD in Groningen. I will never forget the moment you said *"welcome to the Netherlands"* and I didn't even understand what you meant. Shortly afterwards, I was in Groningen having the greatest experience of my life. Thanks Han for your guidance, enthusiastic encouragement and friendly critics: you were always at your office with a big smile and available to receive my worries. I also thank my supervisor Toos Daemen for accepting me as international PhD student and for teaching me to stay focus, to have a

clear purpose when performing my experiments and for keeping my progress on schedule. I also need to thank Toos for her patience with my English and for the few lessons on this topic. My greatest thanks are also extended to Professor Klaas Nico Faber, you are big(Tall)! At the beginning, I was a bit scared, I literally felt like a hobbit (with my Colombian average high) standing next to you, soon I realized that all the knowledge that you have and share is proportional to your size. Thanks Klaas Nico for all scientific critics to my work, for the methodological advices and the good ideas to answer my research questions. This young researcher has learned from each of you.

I thank the members of my Assessment committee Prof. F.M. Reggiori, Prof. P. Olinga and Prof. M. Odenthal for your valuable suggestions to this thesis. Your comments have improved this manuscript and opened a window of opportunity to better understand the data that I have collected.

Professors Anke, Jolanda Smit and Izabela, thank you for attending to my journal clubs and work discussions and for all the questions you posed, for your insightful suggestions to my project and for always being as critical as possible. Dear Jolanda O. from you I have learned what efficiency means, I have never ever meet a more diligent person than you, thanks for all your help. I value highly the assistance provided by the technicians in the three research groups I have be part of, MDL, Virology and LDS. To Manon, Tjasso, Janette and Dianne; Annemarie, Baukje-Nynke, Denise, Jacqueline, Marijke and Heidi; and LDS Nils, Aycha and Angelica, a big thank you for the knowledge you have shared with me, for teaching me to be more efficient and more importantly, thank you for being so kind to me and for always being available to help me out.

I would like to make a special mention to my “support-cellular stress team” Mayra and Liliana, thanks for all the discussions about cellular stress (even ours), I have really enjoyed every moment analyzing graphs, trying to find solutions and supporting each other. To my office mates Gabriela, Georgia, Berit, Lili, Shiva and Ana Huerta thank you for your company, it was a great motivation to share moments with you while working extra-hours and during weekends. To all my PhD-mates and others from MDL (Natalia, Yana, Turu,

Danial, Fabio, Ying, Yang, Archie, Ali, Werna, Mengfan, Herson and Rafael, Guido 32) and Virology (Jhon, Ellen, Julia, Aurora, Amarita, Georgia, Mariana, Yoshita, Dong Wei, Berit, Alberto, Stephanie, Cesar) groups I thank you for sharing the ups and downs of our learning process, which definitely count as sessions of psychological therapy.

I guess there is no better band than the Lucky Lekker Lekker, and if you do not believe me, ask our manager Maria Zorro. Ailine, Andres and Javier our success in music is only comparable to our success as Olympic athletes. Tokyo 2020 waits for us! (fortunately, not for the opening show). Guys: I really hope the LLL performs at least for one concert to our Groningen friends.

To my beloved friends in Groningen thanks for all moments of joy, for the delicious food, for the BBQs, for the dancing moments, for the movies. All the Colombians, Gabriela, Sandra Viviana, Ailine, Andres, Maria, David, Alejandro, Julio, Javier, Liliana, Cristina, Diego, Laura, Mayra, Viviana Molano, Angelica (mamichula), Andrés Quiñonez, Mariam, Susana; and the group with approved Colombian passport, Maria Margarita (Mago), Marty, Genaro, Vlad and Jens; and the fantastic Dutchjes Nils, Mitch, Tim, Michael, and Edwin de Vrij. We were all strangers awaiting to meet on the specific place and time to become a family, please do not forget when David tried to sing: A mis amigos les adeudo la ternura, y las palabras de aliento y el abrazo...(I guess, we will never forget His beautiful and harmonious voice). With all of you I always felt like home, Colombia was always close. Ailine and Lili, thanks for your help and for accepting my invitation as Paranympths. Lili, so many stories together, sharing good and not so good moments but always learning from each other, you will always be in my heart because since I left home you helped me to build one in Groningen. Ailine you are now part of my family, you have accepted me with all my complexities. Mayra amiga, I have learned a lot from you, thanks for all moments shared, I believe in your dreams and I know you are here to make big things in science, it is an honor to be your friend. Maria y Negro, I definitely love you so much guys, please adopt me. Jose, definitively I have learned a lot from you all these years through, but the most important learning is to love people

around you as the way they are, my thanks are not for you I will say thanks to the destiny or may be the life for crossed our paths at the right moment.

I apologize if I forgot someone, it was not my intention, after finishing writing a thesis, corrected it, and trying to finish this process successfully, my neuron is overloaded and it doesn't work anymore...bye bye neuron your time is over.

Finally, thank you Groningen...every road comes to an end and that is needed to continue growing and evolving. My adventure started on March 14th, 2014 and finished on May 25th, 2017 in a town that will be always in my mind and in my heart. Groningen has not ended, Groningen is part of every road I have ahead.

Curriculum vitae

Wilson Alfredo Ríos-Ocampo

E-mail: wilson.rios@udea.edu.co / fredrios26@gmail.com

Medellin, Colombia

Professional profile

I am a Biologist with extensive experience and knowledge in Biomedical Sciences: Cellular and Molecular Biology, Oncology, Immunology and Virology. My research is focused on oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and unraveling adaptive mechanisms during cellular stress. Twelve years working in basic and clinical research. I have a scientific-oriented profile with competencies in science construction and divulgation, analysis and interpretation of scientific literature, situational leadership, multidisciplinary team work, assertive communication and results-orientated.

Personal Information

Date and place of birth: November 26th 1984 Medellin-Colombia

Contact address (Office): Sede de Investigación Universitaria-SIU
University of Antioquia
St. 62 N 52-59, Tower II, Laboratory 434
Medellin, Colombia

Phone number (Office): +57 4 219 65 67

Personal: +57 301 777 57 25

Education

PhD.

Completed (Thesis approved / Promotion will be held on October 10th, 2018).

University of Groningen, University Medical Center Groningen.

Promotors: Prof dr. Han Moshage, Prof. dr. Toos Daemen. Prof. dr. Klaas Nico Faber.

Thesis: Cellular stress response during hepatitis C virus infection: A balancing act between viral persistence and host-cell survival.

Groningen, the Netherlands.

March 2014-May 2017.

MSc. Biomedical Sciences.

University of Antioquia.

Promotors: Prof dr. María Cristina Navas.

Thesis: Molecular characterization of the hepatitis B virus ORFs S and P isolated from blood donors with serological profile HBsAg-/ Anti-HBc+.

Medellin, Colombia.

February 2010 – February 2013.

BSc Biology.

University of Antioquia.

Promotors: Prof dr. María Cristina Navas.

Thesis: Hepatitis C virus core protein detection in cirrhosis and hepatocellular carcinoma cases.

Medellin, Colombia.

August 2002-October 2008.

List of publications

Submitted: W. Alfredo Ríos-Ocampo, María Cristina Navas, Klaas Nico Faber, Toos Daemen, Han Moshage. **The cellular stress response in hepatitis C virus 39 infection: a balancing act to promote viral persistence and host cell survival.** Submitted to: Virus research.

Submitted: Rios-Ocampo WA, Daemen T, Buist-Homan M, Faber KN, Navas MC and Moshage H. **Hepatitis C virus Core or NS3/4A protein expression preconditions hepatocytes against oxidative stress and endoplasmic reticulum stress.** Submitted to: Redox Report.

Submitted: Rios-Ocampo WA, Navas MC, Faber KN, Daemen T and Moshage H. **Hepatitis C Virus proteins Core and NS5A are highly sensitive to oxidative stress-induced degradation after eIF2a/ATF4 pathway activation.** Submitted to: Antioxidants and redox signaling.

Alejandra Duque Jaramillo, Luisa F. Restrepo, Carolina Mantilla-Rojas, Mónica Toro, Juan Camilo Olarte, W. Alfredo Ríos-Ocampo, Fabián Cortés-Mancera, María Cristina Navas. **Frequency of Antibodies to Hepatitis E in Blood Donors in the Municipality of Yarumal, Antioquia.** *Rev Col Gastroenterol.* 2016; 31(3): 229-234

Rios-Ocampo WA, Cortes-Mancera F, Olarte JC, Soto A, Navas MC. **Occult hepatitis B virus infection among blood donors in Colombia.** *Virol J.* 2014; 11:206

Ríos-Ocampo W. Alfredo, Restrepo Juliana, Cortes-Mancera Fabián, Correa Gonzalo, Navas María Cristina. **Occult Hepatitis B Virus Infection: Clinical, Epidemiological and Molecular aspects.** *Acta Medica Colombiana.* 2013; 38: 1-11.

Navas MC, Suarez I, Carreño A, Uribe D, Ríos-O WA, Cortes-Mancera F, Martel G, Vieco B, Lozano D, Jimenez C, Gouas D, Osorio G, Hoyos S, Restrepo JC, Correa G, Jaramillo S, Lopez R, Bravo LE, Arbelaez MP, Scoazec JY, Abedi-

Ardekani B, Santella RM, Chemin I, Hainaut P. **Hepatitis B and Hepatitis C Infection Biomarkers and TP53 Mutations in Hepatocellular Carcinomas from Colombia.** *Hepat Res Treat.* 2011; 2011: 582945. Epub 2011 Oct 31

Book chapters

Rios-Ocampo WA, di Filippo Villa D, Navas MC. **Chapter 4: Hepatitis C. Homo sapiens Infectious diseases. 1st edition.** January 2015. ISBN: 9789588843155

